

ショウジョウバエLingererタンパク質の記憶に果たす役割の解明

著者	木村 真吾
号	12
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第282号
URL	http://hdl.handle.net/10097/57661

	きむら しんご
氏名（本籍地）	木村 真吾
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第282号
学位授与年月日	平成26年6月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	ショウジョウバエ Lingerer タンパク質の記憶に果たす役割の 解明
博士論文審査委員	（主査） 教授 山元 大輔 教授 八尾 寛 准教授 筒井 健一郎

論文内容の要旨

【序論】

食べる、寝る、交尾するなどの生得的行動は、遺伝的プログラムの発露とみなすことができる。その一方で、これらの行動は学習と記憶によって変容する。本研究では、キイロショウジョウバエを実験材料に用いて、生得的行動の学習による変容と記憶の分子メカニズムを解明する。具体的には、オスの性行動異常突然変異体の原因遺伝子として同定されたlingerer遺伝子に着目し、それが記憶形成に関与するかどうか、そして記憶形成に必要であると知られているorb2と相互作用するかを検討した。Lingererタンパク質は、RNAとの結合やその代謝と関連深いドメインを持っており、シナプス局所的なmRNAの翻訳調節を介してシナプス構造、機能の長期的な変化に関与していることが予想される。本研究では、求愛条件付けを用いた実験によってlingererおよびorb2変異が行動レベルで遺伝的相互作用を示すこと、また、共免疫沈降実験によってLingererとOrb2両タンパク質が物理的相互作用を示すこと、さらに免疫染色によってLingererとOrb2両タンパク質が脳内の全域にわたって共発現していることを明らかにする。

【方法】

キイロショウジョウバエのオス1匹を既交尾メス1匹の入った小容器に入れると、オスは処女メスに対する時と同様に既交尾メスに対しても一連の定型的な求愛行動を行う。しかし既交尾メスは通常拒絶するため交尾は成功せず、オスは求愛行動の開始と中断を繰り返す。このような経験（訓練）を与えた後、このオスを処女メス1匹の入った小容器に入れると、処女メスに対する求愛頻度が、訓練していない場合と比較して著しく低下する。この求愛頻度の低下は、オスがメスのフェロモンを、交尾の失敗という罰刺激と連合する古典的条件付けの結果である（Siegel and Hall, 1979; Ejima et al., 2005）。本研究ではlingerer変異ならびにorb2変異が、このような求愛条件付けに対してどのような影響を及ぼすか、訓練直後（学習成績）と訓練後1日後（長期記憶）にオスの求愛活動を計測して検討した。

さらに、ショウジョウバエ由来の培養細胞であるS2細胞を用いた共免疫沈降実験によって、Orb2タンパク質とLingererタンパク質が複合体を形成するかを調べた。また、各タンパク質を認識する抗体を用いた免疫染色によって、野生型ショウジョウバエ成虫オスの脳内でOrb2とLingerer両タンパク質が共発現するかを調べた。

【結果と考察】

orb2、lingerer変異体のオスを求愛条件付けの起こる条件に置き、メスへの求愛低下を指標として「学習」「長期記憶」を評価した。その結果、orb2変異ホモ接合体オスの「学習」は野生型に比して遜色なく正常であったが、「長期記憶」は野生型に比して有意に低下していた。さらに、orb2変異ヘテロ接合体オスでもorb2変異ホモ接合体と同様の結果が得られた。一方、lingerer変異についてはホモ接合体、ヘテロ接合体オスのどちらも「学習」「長期記憶」は正常であった。ところが、orb2変異ヘテロ接合体に1コピーのlingerer変異を持たせたオス（二重ヘテロ接合体）では、「長期記憶」の低下が救済され、正常となった。この結果は、lingererとorb2の遺伝的相互作用を示している。そこで、長期記憶形成においてLingererタンパク質がOrb2タンパク質と相互作用する可能性を検討した。

共免疫沈降実験の結果、Lingererタンパク質がOrb2と共沈降すること、すなわち細胞内においてLingererタンパク質とOrb2タンパク質が同一の複合体に含まれることがわかった。さらに、野生型成虫オスの脳の免疫染色の結果、Lingererタンパク質とOrb2タンパク質はどちらも脳内の多数の細胞で発現しており、特に細胞体の細胞質において顕著な共局在が見られた。

Orb2 タンパク質は、翻訳調節因子として知られる細胞内ポリアデニル化配列結合タンパク質（cytoplasmic polyadenylation element binding protein; CPEB）の1つで、プリオン様ドメイン、RNA 認識モチーフ（RRM）を持つ。Orb2 タンパク質のプリオン様ドメインは、神経活動依存的に非活性型から活性型に変化し多量体化するとされる（Majumdar et al., 2012）。活性型 Orb2 タンパク質は RNA 認識モチーフを介して結合している mRNA の翻訳抑制を解除し、そこで新たに合成されたタンパク質によってシナプス構造、機能の永続的な変化が起き、長期記憶が形成されると考えられている（Krüttner et al., 2012）。本研究の lingerer、orb2 二重ヘテロ接合体オスを用いた求愛条件付けの実験結果は、Orb2 タンパク質による長期記憶形成過程に対して Lingerer タンパク質が抑制的に働く可能性を示唆している。したがって、逆に lingerer 機能を亢進させると長期記憶形成が阻害されると予想された。そこで、Lingerer タンパク質を過剰発現させたオスの「長期記憶」を測定したところ、予想通り野生型に比べて有意に低下していた。今後は、Lingerer タンパク質が Orb2 タンパク質による長期記憶形成過程をどのようにして抑制しているのかを調べるのが重要と考えている。さらに、Lingerer とタンパク質レベルおよび表現型レベルで相互作用を示すことが報告されている orb、rasputin、dfmr1 についても同様に Orb2 との関係を明らかにすることも重要であろう。Lingerer、Orb2、Orb、Rasputin、dFMR タンパク質はいずれも昆虫から哺乳類に至るまで広く保存されており、様々な種類の神経系に共通する記憶形成メカニズムの解明につながると期待される。

論文審査結果の要旨

本研究は、RNA の制御に関わることが推定される機能不明のタンパク質、Lingerer (Lig) に着目し、それが長期記憶の形成に関与する可能性について、ショウジョウバエ遺伝学を武器に検討したものである。Lig をコードする *lig* 遺伝子は、交尾終了時に交尾器接続解除が滞る突然変異体の変異原因遺伝子として同定された。Lig タンパク質はユビキチンと結合するとされる UBA ドメイン、並びに RNA 結合モチーフの RGG ボックスを有し、Rasputin、FMR1 (Fragile X mental retardation 1) 及び CPEB ファミリーの Orb の 3 つのタンパク質と複合体を形成して、標的となる mRNA の翻訳制御に関わることが示唆されている。これらの相互作用因子の一つ、Orb と構造的に類似したタンパク質、Orb2 がショウジョウバエには存在し、これが失われると長期記憶が形成されなくなることが知られている。そこで、Orb と複合体を形成する Lig が、この Orb2 とも複合体を形成し、長期記憶の形成に関わる可能性が想定される。本研究は、この仮説の妥当性を実験的に検証することを目的としている。

長期記憶の評価には、求愛条件付けと呼ばれるパラダイムを用いた。雄個体を既交尾雌と一緒にして交尾拒否を経験させ、その後処女雌と一緒にすると、その雄は処女雌に対しても求愛しなくなる現象である。この求愛抑制は数日にわたって持続する長期記憶となって保持される。*Orb2* の変異を持つ個体は、既報の通り、ホモ接合、ヘテロ接合ともに長期記憶障害を示した。一方、*lig^p* のホモ接合、ヘテロ接合個体は、いずれも長期記憶を正常に形成した。注目すべきことに、*orb2* ヘテロ接合体に *lig^p* 変異をヘテロに持たせたダブルヘテロ接合個体では、長期記憶は正常であり、*lig^p* 変異が *orb2* 変異の記憶障害を優性に抑圧することが分かった。このことは、*orb2* と *lig* が共通の生物学的過程に関わることを示唆している。また、両遺伝子産物は多数の神経細胞とともに発現している。さらに、培養細胞抽出物を用いた免疫沈降実験により、Orb2 と Lig とが同一のタンパク質複合体に含まれることが示された。これらの結果から、Lig が Orb2 を負に制御して、長期記憶の形成を調節することが明らかとなった。

このように、長期記憶形成に関わる新たな制御機構を見出した事実は、木村真吾が自立して研究活動を行うに必要な高度な研究能力と学識を有することを示している。したがって、木村真吾提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。